

# 紫草素诱导人前列腺癌 PC-3 细胞凋亡机制的探讨

陈永强, 郑璐, 刘军权, 周燊, 陈玲, 曹希亮, 周忠海\*, 陈复兴\*  
(解放军第97医院, 江苏徐州 221004)

**[摘要]** **目的:**研究紫草素诱导人前列腺癌细胞(PC-3)凋亡及其作用机制。**方法:**以 PC-3 细胞为研究对象,以不同浓度的紫草素处理 PC-3 细胞,另设空白组,处理不同时间后,分别采用噻唑蓝(MTT)法检测紫草素对 PC-3 细胞增殖抑制情况;显微镜观察细胞形态变化;流式细胞仪检测细胞中活性氧(reactive oxygen species, ROS)的产生;蛋白质免疫印迹(Western blot)检测 B 细胞淋巴瘤/白血病-2(Bcl-2), Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax), 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)和磷酸化-细胞外信号调节激酶 1/2(p-ERK1/2)蛋白的表达。**结果:**不同浓度的紫草素对 PC-3 细胞的生长抑制呈时间和剂量依赖性;形态学观察结果显示紫草素作用 PC-3 细胞后可使细胞变圆,脱落,皱缩,细胞内出现空泡,周围出现凋亡小体;与空白组比较,不同浓度的紫草素明显升高 Caspase-3 和 Bax 蛋白的表达,明显降低 Bcl-2 蛋白的表达,不同浓度的紫草素作用细胞 48 h 后可诱导细胞产生 ROS, ROS 清除剂二巯苏糖醇(DTT)可以明显逆转紫草素诱导的 PC-3 细胞的生长抑制率,且 0.2 mmol·L<sup>-1</sup> DTT 可以抑制由紫草素诱导的 Caspase-3 和 ERK1/2 的活化。**结论:**紫草素通过 ROS/ERK1/2 信号通路诱导人前列腺癌 PC-3 细胞发生凋亡。

**[关键词]** 紫草素; 人前列腺癌 PC-3 细胞; 活性氧; 细胞凋亡

**[中图分类号]** R285.5; R737.25 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)16-0159-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2016160159

## Mechanism of PC-3 Cells Apoptosis Induced by Shikonin

CHEN Yong-qiang, ZHENG Lu, LIU Jun-quan, ZHOU Yu, CHEN Ling, CAO Xi-liang,  
ZHOU Zhong-hai\*, CHEN Fu-xing\*  
(No. 97th Hospital of PLA, Xuzhou 221004, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the mechanism of shikonin-induced apoptosis in PC-3 cells. **Method:** The PC-3 cells were cultured and treated with different concentrations of shikonin *in vitro*. The anti-proliferative effect of shikonin was performed by MTT assay. The morphologic change was observed by the contrast phase microscope. Intracellular reactive oxygen species (ROS) generation was measured by flow cytometric analysis. The protein expressions of Bax, Bcl-2, Caspase-3 and p-ERK1/2 were examined by Western blot analysis. **Result:** Shikonin inhibited PC-3 cell growth in a time-and dose-dependent manner. The morphologic changes including cell shrinkage, cavitations, shedding and apoptosis bodies in PC-3 cells were observed after treatment with shikonin. The expressions of Bax and Caspase-3 were up-regulated, and Bcl-2 expression was down-regulated. Shikonin also induced the production of ROS in a dose-dependent manner. The cell growth inhibition ratio of shikonin-treated group was markedly decreased by ROS scavenger DTT. In addition, pretreatment of PC-3 cells with 0.2 mmol·L<sup>-1</sup> DTT could reverse the shikonin-induced activation of Caspase-3 and ERK1/2. **Conclusion:** Shikonin could induce apoptosis in PC-3 cells by ROS/ERK1/2 pathways.

**[Key words]** shikonin; prostate cancer PC-3 cells; reactive oxygen species; apoptosis

**[收稿日期]** 20150906(007)

**[基金项目]** 南京军区医学科技创新研究基金项目(11MA040, 11MB006)

**[第一作者]** 陈永强, 硕士, 技师, 从事中药单体化合物分子药理学研究, Tel: 13852083649 E-mail: chen Yongqiang\_163@163.com

**[通讯作者]** \* 陈复兴, 硕士, 主任技师, 从事肿瘤免疫治疗研究, Tel: 13685179196, E-mail: chen fuxing@TITC@163.com;

\* 周忠海, 硕士, 主任技师, 从事分子免疫药理学研究, Tel: 15805215211, E-mail: zhouzhonghai298@aliyun.com

前列腺癌在发达国家其发病率居男性恶性肿瘤之首<sup>[1]</sup>。在我国前列腺癌的发病率,随着人口老龄化的加剧、生活方式改正呈快速增长趋势。目前,治疗前列腺癌主要采用睾丸切除术联合内分泌治疗,而前列腺癌经内分泌治疗后由激素依赖性最终转为更具侵袭性的雄激素非依赖前列腺癌,是目前前列腺癌患者死亡的主要原因<sup>[2]</sup>。因此,开发更多针对前列腺癌的新型药物,正成为前列腺癌研究热点。

紫草素是从紫草根中提取的一种萘醌类化合物,具有抗炎、抗肿瘤等作用<sup>[3-4]</sup>。研究表明紫草素可以通过 PI3K/Akt, ROS/p38 和线粒体途径等抑制乳腺癌、肝癌、胃癌、宫颈癌等多种肿瘤细胞的增殖并诱导细胞凋亡<sup>[5-10]</sup>。目前国内外有关紫草素对人前列腺癌细胞增殖与凋亡的研究报道甚少。因此,本实验选用人雄激素非依赖性前列腺癌 PC-3 细胞为研究对象,研究紫草素在体外对 PC-3 细胞生长的抑制作用并探讨其机制,旨在为进一步开发靶向治疗雄激素非依赖性前列腺癌的候选小分子化合物提供一定的理论与实验依据。

## 1 材料

**1.1 细胞株** 人前列腺癌 PC-3 细胞购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心。

**1.2 药物及试剂** 紫草素(美国 Sigma 公司,批号 S7576),用二甲基亚砜(DMSO)溶解配制母液为  $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,实验时再用 RPMI-1640 培养基稀释至各实验浓度(各实验组 DMSO 终体积分数  $\leq 0.1\%$ ),空白组中加入相同浓度的 DMSO; RPMI-1640 培养基及胎牛血清(美国 Gibco 公司,批号分别为 11875-085, 10438-026); 噻唑蓝(MTT),二硫苏糖醇(DTT),蛋白质免疫印迹(Western blot)及 IP 细胞裂解液试剂盒,BCA 蛋白浓度测定试剂盒,SDS-PAGE 凝胶试剂盒,PVDF 膜,BCIP/NBT 碱性磷酸酯酶显色试剂盒和活性氧检测试剂盒(碧云天生物技术研究,批号分别为 ST316, ST041, P0013, P0010, P0012A, FFP36, C3206, S0033);兔抗人 B 细胞淋巴瘤/白血病-2(Bcl-2),Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax),半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(Caspase-3),磷酸化-细胞外信号调节激酶 1/2(p-ERK1/2)和甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)一抗,碱性磷酸酶标记抗兔二抗(美国 Bioworld 公司,批号分别为 BS6420, BS4294, BS7004, AP0484, AP0063, BS10550);其余试剂均为国产分析纯。

**1.3 仪器** DYC P31A 型电泳槽(北京市六一仪器厂),HV-3000 型电泳仪(北京东方特力科贸中心),

LSR II 型流式细胞仪(美国 BD 公司)。

## 2 方法

**2.1 细胞培养** 人前列腺癌 PC-3 细胞于  $37 \text{ }^\circ\text{C}$   $5\% \text{ CO}_2$  的条件下在含体积分数为  $10\%$  胎牛血清的 RPMI-1640 培养液中培养。

**2.2 MTT 法测细胞增殖抑制实验** 取对数生长期的 PC-3 细胞,用胰酶消化液消化后制成细胞悬液,以每孔  $5 \times 10^3$  个细胞铺入 96 孔板,放入细胞培养箱中过夜,使细胞贴壁。然后加入终浓度分别为  $0.5, 1, 2, 4, 8, 10 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的紫草素,每组设置 4 个复孔,同时设置对照和空白。置于培养箱中继续培养至不同时间点,每孔加入  $10 \text{ } \mu\text{L}$  的 MTT 再培养 3 h 后,吸弃上清液,每孔加入  $200 \text{ } \mu\text{L}$  DMSO 溶解,于酶标仪  $492 \text{ nm}$  下测定各孔吸光度  $A$ ,根据以下公式计算抑制率。

$$\text{抑制率} = (A_{\text{空白组}} - A_{\text{实验组}}) / (A_{\text{对照组}} - A_{\text{空白组}}) \times 100\%$$

**2.3 细胞形态学观察** 取状态良好的 PC-3 细胞,用胰酶消化后以每孔  $5 \times 10^4$  个细胞的密度接种于 6 孔板中,培养 24 h 后加入浓度为  $0, 2, 4, 8 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的紫草素,作用 48 h 后分别用倒置显微镜观察细胞形态并拍照。

**2.4 流式细胞仪分析 ROS 的产生** 将经不同浓度紫草素( $0, 0.5, 1, 2, 4, 8 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )处理 48 h 后的 PC-3 细胞,用胰酶液消化收集,并用 PBS 清洗 1 次。然后加入  $0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 DCF-DA,  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  孵育 20 min 后,用 PBS 清洗后上机进行 ROS 分析。

**2.5 Western blot 分析蛋白的表达** 将经  $4 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  紫草素或/和 DTT( $0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ )处理 48 h 的 PC-3 细胞,用 Western blot 及 IP 细胞裂解液  $60 \text{ } \mu\text{L}$  充分裂解提取蛋白,BCA 法测样品蛋白浓度后用  $10\% \text{ SDS-PAGE}$  分离,然后将蛋白转移到 PVDF 膜上,质量分数为  $5\%$  的脱脂奶粉封闭 2 h,一抗( $1:500$ )  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  封闭过夜,二抗( $1:1000$ )  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  孵育 2 h。然后用 BCIP/NBT 碱性磷酸酯酶显色试剂盒,按照操作手册进行显色。结果用数码相机进行拍照记录,实验重复 3 次。

**2.6 统计学分析** 采用 SPSS 13.0 统计分析软件进行单因素方差分析,所有实验结果均得自 3 次独立实验,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 紫草素诱导 PC-3 细胞凋亡的作用** 不同浓度紫草素( $0.5, 1, 2, 4, 8, 10 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )分别作用 PC-3 细胞 12, 24, 48 h 后发现,紫草素在  $2 \sim 10 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$

对 PC-3 细胞增殖具有一定的抑制作用,且呈时间剂量依赖性。见图 1A。紫草素作用 PC-3 细胞 24 h 和 48 h 的  $IC_{50}$  分别为  $5.12 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  和  $3.58 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 因此后续选择  $4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的紫草素作用 PC-3 细胞 48 h 进行实验。形态学观察结果如图 1B 显示,空白组细胞生长情况较好,贴壁较牢固,细胞间紧密相连;随着紫草素浓度增加,细胞逐渐变圆,脱落,悬浮细胞逐渐增多,且悬浮细胞出现皱缩和空泡,周围出现凋亡小体状,呈现出明显的凋亡特征。此外,经 2, 4, 8  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的紫草素作用 48 h 后,促凋亡蛋白 Caspase-3 和 Bax 表达量逐渐增强,而抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达量逐渐减弱 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ) 呈剂量依赖性,见图 1C 及 1D。

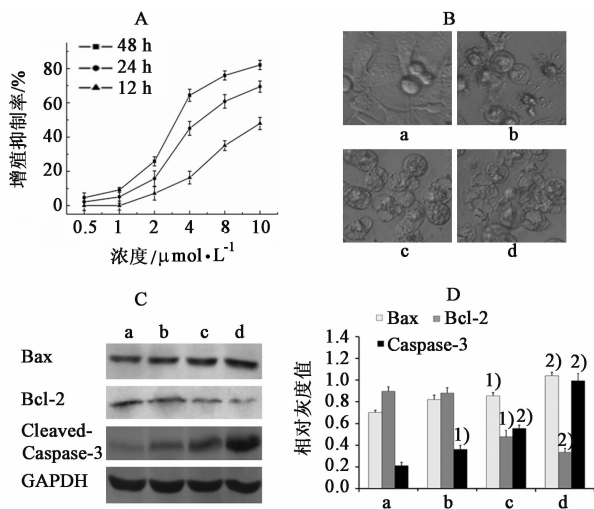
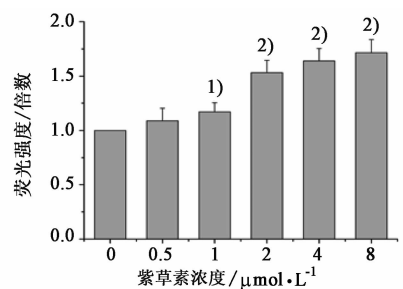


图 1 紫草素诱导 PC-3 细胞凋亡的作用 ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )  
A. 空白组; B. 紫草素 2  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  组; C. 紫草素 4  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  组; D. 紫草素 8  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  组 (图 3 同)

与空白组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05, ^2) P < 0.01$   
图 1 紫草素诱导 PC-3 细胞凋亡的作用 ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )  
Fig. 1 PC-3 cells apoptosis induced by shikonin ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

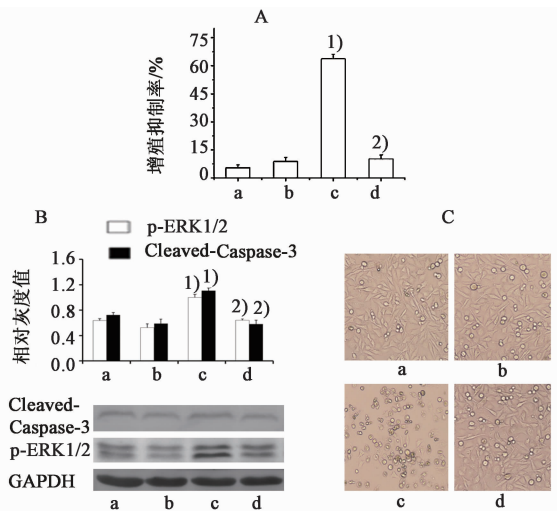
**3.2 紫草素诱导 PC-3 细胞 ROS 的产生** DCFH-DA 本身没有荧光,可以自由穿过细胞膜进入细胞,在胞内可以被酯酶水解生成 DCFH,而 DCFH 不能通透细胞膜,其在细胞内可被细胞内 ROS 氧化生成有荧光的 DCF,其荧光强度与细胞内 ROS 水平成正比。不同浓度的紫草素 (0.5, 1, 2, 4, 8  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 分别作用 PC-3 细胞 48 h 后发现紫草素可以诱导大量 ROS 的产生,且呈剂量依赖性 ( $P < 0.05, P < 0.01$ )。见图 2。

**3.3 ROS 对紫草素诱导 PC-3 细胞凋亡的影响** 加入活性氧清除剂 0.2  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  DTT 后,4  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  紫草素诱导 PC-3 细胞增殖抑制率由 ( $63.75 \pm 2.42$ )% 降低到 ( $10.23 \pm 2.05$ )%, 而单加 DTT 对 PC-3 细胞增殖抑制率没有明显影响。见图 3A 及



与空白组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05, ^2) P < 0.01$   
图 2 紫草素诱导 PC-3 细胞 ROS 释放的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )  
Fig. 2 Effects of ROS release of PC-3 cells induced by shikonin ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

3C。4  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  紫草素作用 PC-3 细胞 48 h 后,可以诱导 ERK1/2 和 Caspase-3 活性形式 p-ERK1/2 和 Cleaved Caspase-3 的表达,与空白组比较差异有明显统计学意义 ( $P < 0.01$ ),当加入活性氧清除剂 DTT 后,p-ERK1/2 和 Cleaved-Caspase-3 的表达均受到明显抑制 ( $P < 0.01$ ),而与空白组相比,单加入 DTT 对上述蛋白表达均无影响。见图 3B。



与空白组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ ; 与紫草素处理组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.01$   
图 3 ROS 对紫草素诱导 PC-3 细胞凋亡的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )  
Fig. 3 Effects of PC-3 cells apoptosis induced by shikonin ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

4 讨论

紫草素是存在于紫草植物根中的一种萘醌化合物,对多种肿瘤细胞具有较好的抗肿瘤活性<sup>[5-10]</sup>。最近,Jang 等<sup>[11]</sup>研究发现紫草素可以通过抑制雄激素受体的表达,从而抑制前列腺癌 LNCaP 和 22RV1 细胞的增殖。而紫草素对雄激素非依赖型人前列腺癌 PC-3 细胞增殖的影响研究报道甚少。本实验结果显示,紫草素在 2 ~ 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  对 PC-3 细胞增殖具有一定的抑制作用,且呈时间剂量依赖性。

细胞增殖和凋亡的失衡是恶性肿瘤重要的生物

学特征,该平衡的维持是一个多基因参与调控的过程,其中抗凋亡的 Bcl-2 和促凋亡蛋白 Bax, Caspase 家族尤为重要<sup>[12-13]</sup>。诱导细胞凋亡是目前寻找有效的抗肿瘤药物主要方法,而细胞形态学改变,可作为判断凋亡发生的标准。为了进一步探讨紫草素抑制前列腺癌 PC-3 细胞增殖是否跟诱导凋亡相关,本研究结果发现,随着紫草素浓度增加和作用时间延长,可看到较多的典型凋亡细胞特征:细胞核固缩,细胞出现空泡,周围出现凋亡小体状等,呈现出明显的凋亡特征。此外,经 2, 4, 8  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的紫草素作用 48 h 后,紫草素呈剂量依赖性的促进促凋亡蛋白 Caspase-3 和 Bax 表达,而抑制抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达。结果表明紫草素能剂量依赖性诱导 PC-3 细胞的凋亡。

ROS 是重要的细胞信号分子,其可调节 MAPK 蛋白酶家族成员及磷酸化,参与细胞增殖、凋亡及坏死相关的信号转导通路<sup>[8,14-15]</sup>。目前研究报道紫草素可以通过诱导宫颈癌细胞、胃癌细胞和慢性粒细胞白血病细胞等产生大量 ROS 引起细胞凋亡和坏死<sup>[6,9,16]</sup>。因此,本文笔者探讨了 ROS 在紫草素诱导 PC-3 细胞凋亡中的作用及能否激活 ERK1/2。实验结果显示,不同浓度的紫草素作用细胞 48 h 后可以诱导 PC-3 细胞产生大量 ROS,而且 0.2  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  ROS 清除剂 DTT 可以明显逆转紫草素诱导的 PC-3 细胞的生长抑制。另外,DTT 还可以抑制由紫草素诱导的 Caspase-3 和 ERK1/2 的活化。表明在此过程中 ROS 是通过调节 ERK1/2 的活性来诱导 PC-3 细胞凋亡的。

综上所述,紫草素对人前列腺癌细胞 PC-3 细胞的增殖具有一定的抑制作用,其机制是通过诱导 ROS 的产生,既而激活 ERK1/2 介导细胞凋亡,从而发挥其抗肿瘤作用。

#### [参考文献]

[1] Jemal A, Bray F, Center M M, et al. Global cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(2):69-90.  
[2] Amaral TMS, Macedo D, Fernandes I, et al. Castration-resistant prostate cancer: mechanisms, targets, and treatment[J]. Prostate Cancer, 2012(7):65-71.  
[3] Chen X, Yang L, Oppenheim J J, et al. Cellular pharmacology studies of shikonin derivatives [J]. Phytother Res, 2002, 16(3):199-209.  
[4] 冉芳,蒋江涛,赵虹,等. 紫草素通过氧化胁迫诱导 K562 细胞凋亡[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19

(13):221-225.

[5] 陈菊英,刘朝纯,曾智,等. 紫草素通过 PI3K/Akt 通路促进人乳腺癌 MCF-7 细胞自噬[J]. 中国药理学通报, 2013, 29(2):194-198.  
[6] Yingkun N, Lvsong Z, Huimin Y. Shikonin inhibits the proliferation and induces the apoptosis of human HepG2 cells [J]. Can J Physiol Pharmacol, 2010, 88(12):1138-1146.  
[7] Lee M J, Kao S H, Hunag J E, et al. Shikonin time-dependently induced necrosis or apoptosis in gastric cancer cells via generation of reactive oxygen species [J]. Chem Biol Interact, 2014, 280(15):44-53.  
[8] Jang S Y, Lee J K, Jang E H, et al. Shikonin blocks migration and invasion of human breast cancer cells through inhibition of matrix metalloproteinase-9 activation[J]. Oncol Rep, 2014, 31(6):2827-2833.  
[9] 张亚宏,甘莹,郭子华,等. 紫草素通过 ROS/p38 信号通路诱导人宫颈癌 HeLa 细胞凋亡[J]. 中国药理学通报, 2011, 27(6):864-867.  
[10] Wei P L, Tu C C, Chen C H, et al. Shikonin suppresses themigratory ability of hepatocellular carcinoma cells [J]. J Agric Food Chem, 2013, 61(34):8191-8197.  
[11] Jang S Y, Jang E H, Jeong S Y, et al. Shikonin inhibits the growth of human prostate cancer cells via modulation of the androgen receptor[J]. Int J Oncol, 2014, 44(5):1455-1460.  
[12] Youle R J, Strasser A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008, 9(1):47-59.  
[13] Nicholson D W. Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death[J]. Cell Death Differ, 1999, 6(11):1028-1042.  
[14] Mates J M, Segura J A, Alonso F J, et al. Intracellular redox status and oxidative stress: implications for cell proliferation, apoptosis, and carcinogenesis [J]. Arch Toxicol, 2008, 82(5):273-299.  
[15] Zhou J, Chen Y, Lang J Y, et al. Salvicine inactivates beta 1 integrin and inhibits adhesion of MDA-MB-435 cells to fibronectin via reactive oxygen species signaling [J]. Mol Cancer Res, 2008, 6(2):194-204.  
[16] Mao X, Yu C R, Li W H, et al. Induction of apoptosis by shikonin through a ROS/JNK- mediate process in Bcr/Abl-positive chronic myelogenous leukemia (CML) cells[J]. Cell Res, 2008, 18(8) 879-888.

[责任编辑 周冰冰]